

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 7 月 15 日 (15.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/058959 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 9/12, C07H 21/02, C12P 19/34,
C12N 15/54, 1/21 // (C12N 9/12, C12R 1:19)

(74) 代理人: 清水 尚人 (SHIMIZU, Naoto); 〒601-8550 京
都府 京都市 南区吉祥院西ノ庄門口町 1 4 番地 日本
新薬株式会社 知的財産部 Kyoto (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016653

(22) 国際出願日: 2003 年 12 月 25 日 (25.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-376780
2002 年 12 月 26 日 (26.12.2002) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特
許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッ
パ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本新
薬株式会社 (NIPPON SHINYAKU CO., LTD.) [JP/JP];
〒601-8550 京都府 京都市 南区吉祥院西ノ庄門口町
1 4 番地 Kyoto (JP).

添付公開書類:
国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 村井 正俊 (MU-
RAI, Masatoshi) [JP/JP]; 〒659-0033 兵庫県 芦屋市高
浜町 7 番 1-9 1 1 号 Hyogo (JP).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING PNPase

(54) 発明の名称: PNPase の製造法

(57) Abstract: It is intended to provide a process for producing PNPase whereby PNPase can be highly efficiently and conveniently produced while reducing contamination with endotoxins causing problems in synthesizing a nucleic acid polymer as a medicinal material. PNPase is produced by using *Escherichia coli*, etc. having a T7 RNA polymerase gene which has been transformed by an expression vector carrying a PNPase gene and a T7 promoter ligated together. Moreover, the step of purifying PNPase is simplified by using an expression vector having a tag gene or prolonging the culture time.

(57) 要約: 高効率で簡便に PNPase を製造することができ、また医薬品原料としての核酸重合体の合成において問題となるエンドトキシンの混入を低減できる、PNPase の製造法を提供することである。PNPase 遺伝子と T7 プロモーターとを連結する発現ベクターにより、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を有する大腸菌等を形質転換したものをを用いることなどにより、PNPase を製造する。また、PNPase の精製工程をより簡便にするために、タグ遺伝子を有する発現ベクターを利用したり、培養時間を長くする。



WO 2004/058959 A1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

明細書

PNPase の製造法

5 技術分野

本発明は、合成核酸重合体を製造するために有用な酵素である PNPase（ポリヌクレオチドホスホリラーゼ）の製造法に関するものである。

従来の技術

- 10 PNPase は、1955 年に S.Ochoa により発見された酵素であり、リボヌクレオシド二リン酸の可逆的重合を触媒し、無機リンを放出する酵素である。この酵素は、細菌に広く分布しているが、動物には存在しない。

- 試験管内でこの酵素を作用させればリボヌクレオシド二リン酸の重合を行うことができるので、高分子量のホモポリマー、コポリマー、または配列の
15 決まったオリゴマーを合成するのに有用である。

- PNPase は、古典的には細菌から分離抽出して得ることができるが、組換え DNA 手法により微生物内で大量に製造しうる方法も知られている（米国特許第 4 9 1 2 4 9 6 号）。特許文献 1 では酵素遺伝子の発現量を上昇させるために適当な発現制御シグナルを含むベクターに PNPase 遺伝子（以下、「pnp 遺
20 伝子」ともいう）を組み込み、形質転換した菌体内で PNPase を大量に蓄積させた後、菌体破碎を行い PNPase を抽出精製する方法が示されている。

- T7 RNA ポリメラーゼ（Genbank 登録番号 M38308）は、高効率にかつ特異的に T7 プロモーター下流の遺伝子の転写を促進する（米国特許第 4 9 1 2 4 9 6 号・米国特許第 5 6 9 3 4 8 9 号・米国特許第 5 8 6 9 3 2 0 号）。

25

発明の開示

本発明は、従来から知られている方法よりも高効率で簡便に PNPase を製造することができ、また医薬品原料としての核酸重合体の合成において問題となるエンドトキシンの混入を低減できる、PNPase の製造法を主として提供

することにある。

- 本発明者らは、鋭意検討した結果、pnp 遺伝子と T7 プロモーターとを連結する発現ベクターにより、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を有する大腸菌等を形質転換したものをを用いることなどにより、上記課題を解決することができ、本発明を完成した。

本発明として、例えば、下記のことを挙げることができる。

(1) 少なくとも次の工程を含有する PNPase の製造法。

- A. 発現制御シグナルである T7 プロモーターを有するプラスミドに原核生物由来の PNPase 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを構築する工程；

B. 当該ベクターを用いて、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を有する大腸菌又はその類縁菌を形質転換する工程；

C. 当該形質転換体に PNPase 遺伝子を発現させることによって、PNPase を菌体内に蓄積させる工程；

- D. PNPase が蓄積された菌体を回収し、PNPase を抽出精製する工程。
または、

(2) 少なくとも次の工程を含有する PNPase の製造法。

A. 発現制御シグナルである T7 プロモーターを有するプラスミドに原核生物由来の PNPase 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを構築する工程；

- B. 当該ベクターを用いて、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を有する大腸菌又はその類縁菌を形質転換する工程；

C'. 当該形質転換体に PNPase 遺伝子を発現させることによって、PNPase を菌体内に蓄積させ、さらに菌体が壊れ PNPase が菌体外上清中に滲出するまで発現を続ける工程；

- D'. 上清中に滲出した PNPase を回収精製する工程。

この中、上記 (2) の製造法が好ましい。

pnp 遺伝子の起源は特に制限されず、例えば、大腸菌 (例、K12 株、O157 株) やその類縁菌 (例、Salmonella typhimurium) を挙げるができる。本発明においては、特に大腸菌 (特に、K12 株) 由来の pnp 遺伝子が好まし

い。

5 発現制御シグナルである T7 プロモーターを有するプラスミドとしては、T7 プロモーターを有するプラスミドであれば特に制限されないが、菌体内で複製可能であり、特定の制限酵素切断部位を有し、菌体内のコピー数の高い当該プラスミドベクターを用いるのが好ましい。具体例としては、pET 系プラスミド（ノバゲン社製）、pRSET-A、p-RSET-B、pRSET-C（インヴィトロゲン社製）を挙げることができる。

10 また、当該プラスミドについては、本発明に係る PNPase（以下、当該酵素ともいう）にいわゆるタグを付与することができる、タグ遺伝子を有するものが好ましい。このようなタグ遺伝子としては、例えば、His タグ遺伝子、T7 タグ遺伝子、S タグ遺伝子、Nus タグ遺伝子、GST タグ遺伝子、DsbA タグ遺伝子、DsbC タグ遺伝子、CBD_{cex} タグ遺伝子、CBD_{cenA} タグ遺伝子、CBD_{clos} タグ遺伝子、Trx タグ遺伝子、HSV タグ遺伝子、3 × FLAG タグ遺伝子を挙げることができる。特に His タグ遺伝子が適当である。

15 宿主としての大腸菌又はその類縁菌としては、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を有するものであれば特に制限されないが、組換え DNA 実験で使用されるものが好ましい。具体例としては、BL21[DE3]大腸菌、BL21[DE3]pLysS 株大腸菌、BLR[DE3]株大腸菌、Rosetta[DE3]株大腸菌、B834[DE3]株大腸菌を挙げることができる。

20 本発明によって製造された当該酵素を用いれば、核酸ホモポリマー、核酸コポリマー、オリゴ核酸など種々の核酸重合体を合成することができる。合成しうる核酸重合体の具体例としては、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、ポリウリジル酸、ポリアデニル酸、ポリグアニル酸、ポリ（5-ブロモシチジル酸）、ポリ（2-チオシチジル酸）、ポリ（7-デアザイノシン酸）、ポリ（2'-アジドイノシン酸）、ポリ（シチジン-5'-チオリン酸）、ポリ（1-ビニルシチジル酸）、ポリ（シチジル酸、ウリジル酸）、ポリ（シチジル酸、4-チオウリジル酸）、ポリ（アデニル酸、ウリジル酸）を挙げることができる。

25

本発明を実施するための操作自体は、全て公知の方法により行うことができる。

I. 工程A～Dについて

工程A：

- 5 例えば、大腸菌の染色体 DNA から常法により pnp 遺伝子をクローニングすることができる。具体例として、コロニーハイブリダイゼーション法によるクローニングを挙げることができる。

- 次に、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR 法）により、pnp 遺伝子の開始コドンに NdeI 切断点を導入し、また終止コドン下流に EcoRI 切断点を導入し、常法によりこの NdeI 切断点から、pnp 遺伝子を含んだ EcoRI 切断点までの DNA 断片を得ることができる。

この DNA 断片を、予め NdeI および EcoRI で切断し、5'末端を脱リン酸化した、T7 プロモーターを有するプラスミドと常法により混合し結合反応を行うことにより、目的とする発現ベクターを構築することができる。

15 工程B：

上記により得られた発現ベクターを用いて、常法により T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を有する大腸菌又はその類縁菌を形質転換することができる。形質転換された大腸菌等は、常法により凍結保存することができる。

- 形質転換法としては、常法により行うことができ特に限定されない。具体的には、例えば、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法などの方法を挙げることができる。

工程C、C'：

- 当該形質転換体は、増殖可能な培地中で常法により培養増殖することができる。培養増殖に際しては、37℃で例えば一晩、前培養することが好ましい。
- 25 そして、本培養を開始して適当な濁度まで到達した後（例えば、600 nm での濁度が 0.4～1.0）、適当な発現誘導剤を適当量添加して pnp 遺伝子を発現させ、当該酵素を菌体内に誘導することができる。当該誘導剤添加後、例えば7～9時間培養を行えば、菌体内への当該酵素の蓄積が通常最大になるが、さらに例えば24時間培養を続ければ、通常、菌体が自己消化し当該酵素を培養

上清に滲出させることができる。当該酵素を培養上清に滲出させる方が、菌体破壊過程と抽出過程がないためそれだけ純度の高い当該酵素を得ることができる。またエンドトキシンの混入を低減することができる。

上記発現誘導剤としては、例えばイソプロピルー β -D-チオガラクトピラ
5 ノシド（以下、IPTG という）、ラクトースを挙げることができる。

形質転換体の培養は、炭素源、窒素源などの微生物の増殖に必要な栄養源を含有する培地を用いて常法により行うことができる。当該培地としては、例えば、2×YT 培地、LB 培地、M9CA 培地など通常の大腸菌培養に用いられる培地を用いることができる。培養は、例えば 20～40℃の培養温度で必要により通気、攪拌しながら行うことができる。また、培養中におけるプラスミ
10 ドの脱落を防ぐために適当な抗生物質（プラスミドの薬剤耐性マーカーに応じて、アンピシリン、カナマイシンなど）を適当量培養液に加えて培養することもできる。その際、培養後期の発泡によるオーバーフローを防ぐために、適当な消泡剤（例えば、アデカノール LG-109（旭電化工業社製）、
15 AntifoamAF Emulsion（ナカライテスク社製））を適当量添加することもできる。

工程 D、D'：

培養・誘導を終えた菌体を回収し、当該酵素を抽出・精製する方法としては、常法により行うことができる。

20 まず、菌体内に当該酵素が蓄積されている場合には、適当な緩衝液中に菌体を懸濁させ、超音波処理、フレンチプレス処理などの方法により物理的に菌体を破壊し、菌体残渣を除去して当該酵素を得ることができる。精製が必要な場合には、硫酸アンモニウムによる塩析処理、透析処理、エタノールなどの溶媒処理、各種クロマトグラフィー処理、限外濾過などで当該酵素を精
25 製することができる。

長時間の培養・誘導により、当該酵素が培養上清に滲出している場合には、上記のような菌体破壊の工程を省略することができる。

タグ付きで発現した当該酵素の場合には、常法により更に容易に回収精製を行うことができる。例えば、回収した上清を、付与されたタグに適したカ

ラムで処理することにより精製することができる。

本発明方法により製造された当該酵素は、医薬品として使用可能なエンドトキシンフリーの核酸重合体を合成するためにエンドトキシン除去カラムで処理することもできる。なお、長時間の培養・誘導により、培養上清に滲出
5 させて当該酵素を製造した場合には、菌体の破壊という工程が不要であるため、エンドトキシンの混入をそれだけ防ぐことができる。

II. 核酸重合体の合成方法

リボヌクレオシド二リン酸に、本発明方法で得られた当該酵素を常法により作用させることにより、核酸重合体を合成することができる。タグが付与
10 されている当該酵素は、そのまま用いることができるが、常法によりタグを外して用いることもできる。

図面の簡単な説明

第1図は、Hisタグを付与したPNPase (His-PNPase)発現プラスミド pET28
15 a・E.coli・His-PNPaseのプラスミドマップを示す。

第2図は、Hisタグを付与しないPNPase(native-PNPase) 発現プラスミド p
ET30a・E.coli・native-PNPaseのプラスミドマップを示す。

第3図は、Hisタグを付与したPNPaseの活性を示す。縦軸はPNPaseの活性（
U/L培養液）を、横軸は発現誘導後の培養時間（時間）を、それぞれ示す。ま
20 た、黒いカラムは菌体破砕液中のPNPase活性を、白いカラムは培養上清中の
PNPase活性を示す。

第4図は、Hisタグを付与していないPNPaseの活性を示す。縦軸はPNPase
の活性（U/L培養液）を、横軸は発現誘導後の培養時間（時間）を、それぞ
れ示す。また、黒いカラムは菌体破砕液中のPNPase活性を、白いカラムは培
25 養上清中のPNPase活性を示す。

第5図は、ポリイノシン酸の合成反応収率と平均鎖長を示す。左縦軸は合成
反応収率（％）を、右縦軸は平均鎖長（塩基数）を、横軸は時間（時間）をそ
れぞれ表す。—●—は合成反応収率の推移を、---○---は平均鎖長の推移をそ
れぞれ表す。

第6図は、ポリシチジル酸の合成反応収率と平均鎖長を示す。左縦軸は合成反応収率(%)を、右縦軸は平均鎖長(塩基数)を、横軸は時間(時間)をそれぞれ表す。—●—は合成反応収率の推移を、---○---は平均鎖長の推移をそれぞれ表す。

5

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例、試験例により本発明を更に詳述する。但し、本発明が下記実施例に限定されないことは言うまでもない。

実施例1

10 (1) pnp 遺伝子を組み込んだ発現ベクターの構築

大腸菌 C600K 株の染色体 DNA からコロニーハイブリダイゼーション法により pnp 遺伝子をクローニングし、PCR 法により、pnp 遺伝子の開始コドンに NdeI 切断点を導入し、また終止コドン下流に EcoRI 切断点を導入し、常法によりこの NdeI 切断点から、pnp 遺伝子を含んだ EcoRI 切断点までの DNA
15 断片を得た。

この DNA 断片を、予め NdeI および EcoRI で切断し、5'末端を脱リン酸化した発現ベクタープラスミド pET28a (His タグ遺伝子を含む。ノバゲン社製) と混合し結合反応を行い、タグ遺伝子を有する発現ベクターを構築した。

この発現ベクターは、約 2400 塩基対の DNA 断片が挿入された
20 pET28aDNA で構成され、このプラスミドを pET28a・E.coli・His-PNPase と命名した(図1参照)。ベクター由来の一部を含めて、pnp 遺伝子の全 DNA 配列を解読した結果、ベクター由来部分はノバゲン社が発表している配列と一致し、pnp 遺伝子部分は公的遺伝子データベース Genbank 登録番号 NC000913 に記載されている大腸菌 K12 株の pnp 遺伝子相当部分の DNA 配
25 列と完全に一致した。

また、pET28a・E.coli・His-PNPase DNA を NdeI および EcoRI で切断し、アガロースゲル電気泳動を行い、約 2400 塩基対の NdeI-EcoRI DNA 断片を抽出した。次にこの DNA 断片を、予め NdeI および EcoRI で切断し、5'末端を脱リン酸化した発現ベクタープラスミド pET30a (タグ遺伝子を含まない。

ノバゲン社製)と混合し結合反応を行い、タグ遺伝子を有しない発現ベクターを構築した。

この発現ベクターは、約 2400 塩基対の DNA 断片が挿入された pET30a DNA で構成され、このプラスミドを pET30a・E.coli・native-PNPase と命名した(図 2 参照)。

(2) 形質転換体の調製

上記プラスミド pET28a・E.coli・His-PNPase ないし pET30a・E.coli・native-PNPase を用いて、大腸菌 BL21[DE3]株(ノバゲン社製)を常法により形質転換して、各々の形質転換体を調製した。

10 (3) 当該酵素の産出

pET28a・E.coli・His-PNPase を含む大腸菌 BL21[DE3]株の形質転換体ないし pET30a・E.coli・native-PNPase を含む大腸菌 BL21[DE3]株の形質転換体を、カナマイシンを添加した変法 terrific broth 培地(24 g/L 酵母エキス(ナカライテスク社製)、12 g/L トリプトン(ナカライテスク社製)、0.4%[v/v]グリセロール)中で 37℃、約 16 時間往復振盪培養(MR-200L 振盪培養機、高崎科学社製)し、前培養した。

10 L 容卓上型ジャーファーマンター(オリエンタル酵母社製、LS-10)に LB 培地(LB BROTH BASE、インビトロゲン社製、cat No. 12780-052)を仕込み、前培養液を植菌し(培養開始時点での 600 nm での濁度は約 0.2)、37℃、1 vvm、500 rpm で通気培養を行った。600 nm での濁度が 0.5~0.7 に達した時、IPTG(ナカライテスク社製)を 0.4 mM となるよう添加し、発現誘導を行うことにより 2 つの当該酵素をそれぞれ産出した。

なお、発現ベクターの脱落を阻止するため、カナマイシンを 25 mg/L となるよう添加した。消泡剤としてアデカノール LG-109(旭電化工業社製)を、培地 7 L 当たり約 0.2 mL 添加した。

(4) 回収、抽出、精製

①まず、IPTG 添加による発現誘導 3 時間後の培養液 112 L(7 L 培養×16 回)から集めた菌体より、His タグを付与された当該酵素の精製を行った。

菌体を培養液量の約 1/60 量の抽出用緩衝液 A(20 mM Tris-HCl pH8.0、

0.5 M 塩化ナトリウム、10% グリセロール) に懸濁し、50 mg/L となるよう卵白リゾチームを加え、室温で 30 分振盪した後、 -80°C で凍結した。 37°C で凍結菌体を急速に融解した後、アストラソン社製超音波細胞破碎機 XL2020 および cat No.200 の破碎ホーンを用いて、最大出力にて約 5 分間超音波破碎した。菌体破碎液を $20,000\times g$ 、 4°C 、60 分間遠心し、上清を採取し、1.6 L の菌体粗抽出液を調製した。菌体粗抽出液を Ni^{+} 親和性クロマトグラフ ($\phi 2.6\times 20$ 、His Bind Flactogel M、ソバゲン社製) にかき、His タグが付与された当該酵素を精製した。菌体粗抽出液を抽出用緩衝液 A で平衡化したカラムに 5 mL/min にアプライした後、樹脂を 1 L の抽出用緩衝液 A で洗浄し、最後に 1 L の 0.5 M イミダゾールを含む抽出用緩衝液 A で His タグが付与された当該酵素をカラムから溶出した。次に、pH の変更、塩化ナトリウムおよびイミダゾールを除去する目的で、限外濾過膜を用いたダイアフィルトレーションを行った。当該酵素を含む 1 L の溶出液を、限外濾過カートリッジ (PREP/SCALE-TFF、分画分子量: 10,000、ミリポア社製) を用いて約 600 mL まで濃縮し、次に液量を一定に保つように緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH7.0、0.15 M 塩化ナトリウム、5 % グリセロール) を添加しながら限外濾過を行った。濾液が 7 L に達するまで限外濾過を続け、当該酵素溶液の緩衝液組成を変更した。次にこの酵素液をエンドトキシン除去カラム (Kurimover II、 $\phi 2.6\times 10\text{ cm}$ 、栗田工業社製) にかけた。酵素液を 1.7 mL/min で活性化した Kurimover II カラムに通し、通過画分を集めた。次に、pH の変更、塩化ナトリウムを除去する目的で、限外濾過カートリッジを用いたダイアフィルトレーションを行った。酵素液の液量を一定に保つように緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH8.0、5 % グリセロール) を添加しながら、限外濾過を行った。濾液が 7 L に達するまで限外濾過を続け、当該酵素溶液の緩衝液組成を変更した後、 -20°C で凍結保存した。精製の各工程で試料を採取し、当該酵素の活性測定とエンドトキシン量の測定を行った。

その結果を表 1 に示す。

表 1

	PNPase				エンドトキシン	エンドトキシン/ PNPase
	活性 (U/mL)	容積 (mL)	総活性 (U)	収率 (%)	濃度 (EU/mL)	(EU/U)
粗抽出液	553	1,600	885,520	100	ND	ND
Ni+アフィニティカラム溶出液	520	1,000	520,378	59	ND	ND
1 回目ダイアフィルトレーション	365	1,000	364,825	41	626,345	1,717
Kurimover II カラム溶出液	239	950	227,124	26	868	3.6
2 回目ダイアフィルトレーション	248	800	198,714	22	2,299	9.3

ND : 測定せず

表 1 から明らかなように、112 L 培養菌体（誘導後 3 時間培養）から約 20 万ユニットの当該酵素を得ることができた。また、1 回目のダイアフィルトレーション後に多量に含まれていたエンドトキシンは、KurimoverII カラム
5 処理によりほとんど除去され、最終産物には PNPase 1 ユニット当たり、9.3 EU のエンドトキシンが含まれるのみであった。

②次に、IPTG 添加による発現誘導 7 時間後の培養液 56 L（7 L 培養×8 回）から集めた菌体より、His タグが付与された当該酵素の精製を行った。菌体を培養液量の約 1/30 量の抽出用緩衝液 B（20 mM Tris-HCl pH8.0、0.5 M 塩化ナトリウム、5 % グリセロール）に懸濁し、50 mg/L となるよう卵白リゾチームを加え、室温で 30 分間振盪した後、−80℃で凍結した。37℃で凍結菌体を急速に融解した後、アストラソン社製超音波細胞破碎機 XL2020 および cat No.200 の破碎ホーンを用いて、最大出力にて約 5 分間超音波破碎した。
10 菌体破碎液を 20,000×g、4℃、60 分間遠心し、上清を採取し、1.5 L の菌体粗抽出液を調製した。菌体粗抽出液を Ni⁺親和性クロマトグラフにかけ、His タグが付与された当該酵素を精製した。菌体粗抽出液を抽出用緩衝液 B で平衡化したカラムに 5 mL/min にアプライした後、樹脂を 1 L の抽出用緩衝液 B で洗浄し、最後に 1 L の 0.5 M イミダゾールを含む抽出用緩衝液 B で His タグが付与されたタンパク質をカラムから溶出した。次に、pH の変更、塩化ナ
15 トリウムおよびイミダゾールを除去する目的で、限外濾過膜を用いたダイアフィルトレーションを行った。当該酵素を含む 1 L の溶出液を、限外濾過カートリッジを用いて約 600 mL まで濃縮し、次に液量を一定に保つように緩衝液（50 mM Tris-HCl pH7.0、0.15 M 塩化ナトリウム、5 mM 塩化マグネ
20

- シウム、5 % グリセロール) を添加しながら限外濾過を行った。濾液が 7 L に達するまで限外濾過を続け、当該酵素溶液の緩衝液組成を変更した。次にこの酵素液を Kurimover II カラムにかけた。活性化した Kurimover II カラムに酵素液を 1.7 mL/min で処理し、通過画分を集めた。次に、pH の変更、
- 5 塩化ナトリウムを除去する目的で、限外濾過カートリッジを用いたダイアフィльтраーションを行った。酵素液の液量を一定に保つように緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH8.0、5 mM 塩化マグネシウム、5 % グリセロール) を添加しながら、限外濾過を行った。濾液が 7 L に達するまで限外濾過を続け、当該酵素溶液の緩衝液組成を変更した後、 -20°C で凍結保存した。精製の各工程で
- 10 試料を採取し、当該酵素の活性測定とエンドトキシン量の測定を行った。
- その結果を表 2 に示す。

表 2

	PNPase				エンドトキシン 濃度 (EU/mL)	エンドトキシン/ PNPase (EU/U)
	活性 (U/mL)	容積 (mL)	総活性 (U)	収率 (%)		
粗抽出液	615	1,500	921,808	100	ND	ND
Ni+アフィニティカラム溶出液	301	1,100	330,740	36	ND	ND
1 回目ダイアフィльтраーション	288	1,100	253,377	34	156,387	543
Kurimover II カラム溶出液	230	1,100	227,124	27	8,180	35.5
2 回目ダイアフィльтраーション	213	800	170,771	19	207	1

ND : 測定せず

- 表 2 から明らかなように、56 L 培養菌体 (誘導後 7 時間培養) から約 17
- 15 万ユニットの当該酵素を得ることができた。これは、誘導後 3 時間培養 112 L 菌体から精製した当該酵素量とほぼ同じであり、培養時間を延長することで当該酵素収量を増大させることを証明した結果となった。また、1 回目のダイアフィльтраーション後に多量に含まれていたエンドトキシンは、KurimoverII カラム処理によりほとんど除去され、最終産物には当該酵素 1
- 20 ユニット当たり、1.0 EU のエンドトキシンが含まれるのみであった。この数値は、誘導後 3 時間培養 112 L 菌体から精製した当該酵素に含まれるエンドトキシン量 (9.3 EU/U-PNPase) を下回っていた。

- ③次に、IPTG 添加による発現誘導 24 時間後の培養液 28 L (7 L 培養×4 回) から集めた培養上清より、His タグが付与された当該酵素の精製を行った。培養上清を、150 mL/min の速度で、予め 20 mM Tris-HCl pH8.0 で平衡化した陰イオン交換カラム (QAE-TOYOPERL 550C、 ϕ 140×70 mm) にかけた。
- 5 カラムを 5 L の 20 mM Tris-HCl pH8.0、0.1M 塩化ナトリウムを含む緩衝液で洗浄した後、イオン交換樹脂に吸着した当該酵素を 5 L の 20 mM Tris-HCl pH8.0、0.5M 塩化ナトリウムを含む緩衝液で溶出し粗酵素液を得た。粗酵素液を Ni^{2+} 親和性クロマトグラフにかけ、His タグが付与された当該酵素を精製した。粗酵素液を抽出用緩衝液 B で平衡化したカラムに 5 mL/min にアプ
- 10 イした後、樹脂を 1 L の抽出用緩衝液 B、および 1 L の 50 mM イミダゾールを含む抽出用緩衝液 B で洗浄し、最後に 0.5 L の 0.5 M イミダゾールを含む抽出用緩衝液 B で His タグが付与された当該酵素をカラムから溶出した。次に、pH の変更、塩化ナトリウムおよびイミダゾールを除去する目的で、限外濾過膜を用いたダイアフィルトレーションを行った。当該酵素を含む 1 L の
- 15 溶出液を、限外濾過カートリッジ (PREP/SCALE-TFF、分画分子量：30,000、ミリポア社製) を用いて約 500 mL まで濃縮し、次に液量を一定に保つように緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH7.0、0.15 M 塩化ナトリウム) を添加しながら限外濾過を行った。濾液が 7 L に達するまで限外濾過を続け、当該酵素溶液の緩衝液組成を変更した。次にこの酵素液を Kurimover II カラムにかけた。
- 20 活性化した Kurimover II カラムに酵素液を 1.7 mL/min で処理し、通過画分を集めた。次に、pH の変更、塩化ナトリウムを除去する目的で、限外濾過膜 (PREP/SCALE-TFF、分画分子量：30,000、ミリポア社製) を用いたダイアフィルトレーションを行った。酵素液の液量を一定に保つように緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH8.0、5 mM 塩化マグネシウム、5 % グリセロール) を添加
- 25 しながら、限外濾過を行った。濾液が 7 L に達するまで限外濾過を続け、当該酵素溶液の緩衝液組成を変更した後、 -20°C で凍結保存した。精製の各工程で試料を採取し、当該酵素の活性測定とエンドトキシン量の測定を行った。その結果を表 3 に示す。

表 3

	PNPase				エンドトキシン	エンドトキシン/ PNPase
	活性 (U/mL)	容積 (mL)	総活性 (U)	収率 (%)	濃度 (EU/mL)	(EU/U)
粗抽出液	23.9	28,000	669,698	100	ND	ND
陰イオン交換カラム溶出液	70.4	5,000	352,029	53	ND	ND
Ni+アフィニティカラム溶出液	158	500	79,057	12	7,811,004	49,437
1 回目ダイアフィルトレーション	135	500	67,500	10	ND	ND
Kurimover II カラム溶出液	111	500	55,300	8	22	0.2
2 回目ダイアフィルトレーション	87.5	500	43,742	7	105	1.2

ND : 測定せず

表 3 から明らかなように、28 L 培養上清（誘導後 24 時間培養）から約 5 万ユニットの当該酵素を得ることができた。本酵素は、SDS-PAGE/クマシーブルー染色によるタンパク質純度検定において、他のタンパク質の存在をほとんど認めなかった。また、1 回目のダイアフィルトレーション後に多量に含まれていたエンドトキシンは、KurimoverII カラム処理によりほとんど除去され、最終産物には当該酵素 1 ユニット当たり、1.2 EU のエンドトキシンが含まれるのみであった。この数値は、誘導後 3 時間培養 112 L 菌体から精製した当該酵素に含まれるエンドトキシン量（9.3 EU/U-PNPase）を下回っていた。このことから、培養上清からの当該酵素精製は、菌体破碎というスケールアップが困難な過程を省略することができ、かつ純度の高い当該酵素を得る方法であると言える。

試験例 1 当該酵素の活性測定

発現誘導後（IPTG 添加後）、0、1、2、3、5、7、9、24 時間に試料の採取を行い、当該酵素の活性を測定した。

その結果、図 3 および図 4 に示す通り、His タグが付与された当該酵素およびタグが付与されていない当該酵素ともに、誘導後 7～9 時間で菌体内への蓄積が最大となり、24 時間後には減少していた。誘導後 24 時間では、誘導後 7～9 時間で菌体内へ蓄積した量を上回る量の当該酵素が培養上清中に放出されていた（図 3、図 4 参照）。

①当該酵素の活性測定用の試料調製

500mL の遠心管に 400 mL の培養液を採取し、5,000×g、室温、5 分の遠

心分離（日立工機社製 SCR-20BA）により菌体を回収した。上澄みは培養上清として保存した。菌体を 30 mL の 50 mg/L 卵白リゾチームを含む緩衝液（20 mM Tris-HCl pH8.0、0.15 M 塩化ナトリウム、10%[v/v]グリセロール、1 mM Tris-carboxyethylphosphine HCl）に懸濁し、室温で 15 分間放置した後、
5 後、 -80°C 保存した。凍結／融解を 2 回繰り返す、大腸菌を穏和に破碎した後、アストラソン社製超音波細胞破碎機 XL2020 および cat No.200 の破碎ホーンを用いて、最大出力にて約 30 秒間超音波破碎した。菌体破碎液を $10,000 \times g$ 、 4°C 、10 分間遠心し、上清を採取し、菌体粗抽出液を調製した。

②当該酵素の活性測定

10 1.5 mL 容遠心チューブ（エッペンドルフ社製）に $20 \mu\text{L}$ の酵素液と $80 \mu\text{L}$ の当該酵素反応液（125 mM Tris-HCl pH9.0、0.25 mg/mL 牛血清アルブミン、0.5 mM EDTA ニナトリウム、6 mM 塩化マグネシウム、25 mM アデノシン二リン酸三ナトリウム塩）を加えて穏やかに混合し、 37°C で 15 分間保温した。0.9 mL の氷冷した 4 % 過塩素酸ナトリウム水溶液を加えて反応を止
15 めた後、氷上で 10 分間放置した。 4°C 、15,000 rpm、5 分間（トミー精工社製、MR-150）の遠心により、上清を分離した。次に、反応上清中に遊離した無機リン酸を定量するために、96 穴プレート（コーニング社製）に $50 \mu\text{L}$ の上清と $50 \mu\text{L}$ の Tassky-Shorr 試薬（0.5 M 硫酸、10 g/L モリブデン酸アンモニウム、50 g/L 硫酸第一鉄）を加えて 30 秒間攪拌した後、室温で 5 分間
20 放置した。660 nm の吸光度を測定し（Model 550、Bio-Rad 社製）、当該酵素の活性を算出した。ここで定義する 1U とは、 37°C 、pH9.0、15 分間の反応により $1 \mu\text{mole}$ の無機リン酸を遊離させる酵素量である。

実施例 2 ポリイノシン酸の合成

112 L 培養菌体から精製した当該酵素を用いて、ポリイノシン酸（RNA ホモポリマー）の合成を行った。予め、小スケールの合成反応を行い、反応収率が高く平均鎖長の長いポリマーが合成できる条件を決定した。ポリイノシン酸の合成は、総容量 350 mL、反応液組成（100 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES)-NaOH pH7.5、0.4 mM EDTA ニナトリウム、50 mM 塩化マグネシウム、0.1 g/L イ
25

ノシンニリン酸三ナトリウム塩(ヤマサ醤油社製)、11.43 U/mL His-PNPase)、37 °Cで行った。経時的に試料を採取し、その一部を変性条件下(7 M 尿素存在下)でのゲル濾過 HPLC で分析し、平均鎖長と反応収率を計算した。

鎖長は、pUC119(宝酒造社製)の制限酵素 EcoRI、NarI および NspI (New England Bio Lab 社製) による分解物を指標として決定した。

その結果を図 5 に示す。図 5 から明らかなように、37 °C、11 時間の反応により、反応収率約 50 %で平均鎖長が約 2200 塩基のポリノシン酸が得られた。

実施例 3 ポリシチジル酸の合成

10 同様にしてポリシチジル酸の合成を行った。総容量 350 mL、反応液組成(100 mM glycine-NaOH pH9.0、0.4 mM EDTA 二ナトリウム、25 mM 塩化マグネシウム、0.1 g/L シチジンニリン酸三ナトリウム塩(ヤマサ醤油社製)、11.43 U/mL His-PNPase)、37 °Cで行った。経時的に試料を採取し、その一部を変性条件下でのゲル濾過 HPLC で分析し、平均鎖長と反応収率を計算した。

15 その結果を図 6 に示す。図 6 から明らかなように、37 °C、7 時間の反応により、反応収率約 65 %で平均鎖長が約 2200 塩基のポリシチジル酸が得られた。

産業上の利用可能性

20 本発明ではタグを付けた当該酵素を発現させることにより精製が非常に簡便になり、また大腸菌の当該酵素生産量が 2 倍程度増加するという予想外の効果が得られた。また、培養法の工夫により、当該酵素が菌体内に蓄積せず培養上清中に放出されるようになり、菌体破碎による大量のエンドトキシンの混入を防ぐことができるなど、大量培養からでも迅速かつ簡便に当該酵素

25 を精製できる。

請求の範囲

1. 少なくとも次の工程を含有する PNPase の製造法。

(A) 発現制御シグナルである T7 プロモーターを有するプラスミドに原
5 核生物由来の PNPase 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを構築する工程；

(B) 当該発現ベクターを用いて、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を有する
大腸菌又はその類縁菌を形質転換する工程；

(C) 当該形質転換体に PNPase 遺伝子を発現させることによって、
PNPase を菌体内に蓄積させる工程；

10 (D) PNPase が蓄積された菌体を回収し、PNPase を抽出精製する工程
。

2. 上記 C) D) の工程が、各々下記 C') D') の工程である、請求項 1 記載
の製造法。

(C') 当該形質転換体に PNPase 遺伝子を発現させることによって、
15 PNPase を菌体内に蓄積させ、さらに菌体が壊れ PNPase が菌体外上清中に
滲出するまで発現を続ける工程；

(D') 上清中に滲出した PNPase を回収精製する工程。

3. 当該プラスミドが、製造される PNPase にタグを付与することができる
タグ遺伝子を有するものである請求項 1 または 2 記載の製造法。

20 4. タグ遺伝子が、His タグ遺伝子、T7 タグ遺伝子、S タグ遺伝子、Nus タ
グ遺伝子、GST タグ遺伝子、DsbA タグ遺伝子、DsbC タグ遺伝子、CBD_{cex}
タグ遺伝子、CBD_{cenA} タグ遺伝子、CBD_{clos} タグ遺伝子、Trx タグ遺伝子、HSV
タグ遺伝子、又は 3 × FLAG タグ遺伝子である請求項 3 記載の製造法。

5. 原核生物が、大腸菌である請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の製造法。

25 6. 大腸菌が、K12 株大腸菌、又は O157 株大腸菌である請求項 5 記載の製
造法。

7. T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を有する大腸菌が、BL21[DE3]株大腸菌、
BL21[DE3]pLysS 株大腸菌、BLR[DE3]株大腸菌、Rosetta[DE3]株大腸菌、
又は B834[DE3]株大腸菌である請求項 1 ～ 6 記載の製造法。

8. 請求項1～7のいずれかに記載の製造法により製造された PNPase を用いて製造された合成核酸重合体。

9. 合成核酸重合体が、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、ポリウリジル酸、ポリアデニル酸、ポリグアニル酸、ポリ（5-ブロモシチジル酸）、ポリ（2-チオシチジル酸）、ポリ（7-デアザイノシン酸）、ポリ（2'-アジドイノシン酸）、ポリ（シチジン-5'-チオリン酸）、ポリ（1-ビニルシチジル酸）、ポリ（シチジル酸、ウリジル酸）、ポリ（シチジル酸、4-チオウリジル酸）、又はポリ（アデニル酸、ウリジル酸）である請求項8記載の合成核酸重合体。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 1

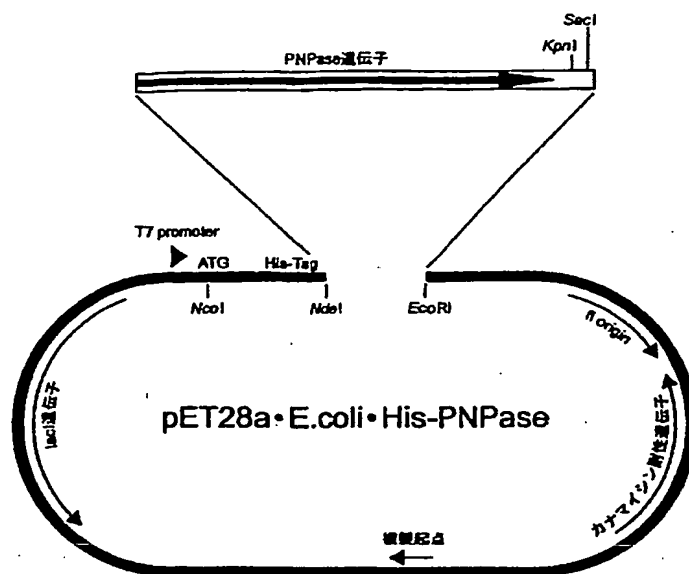
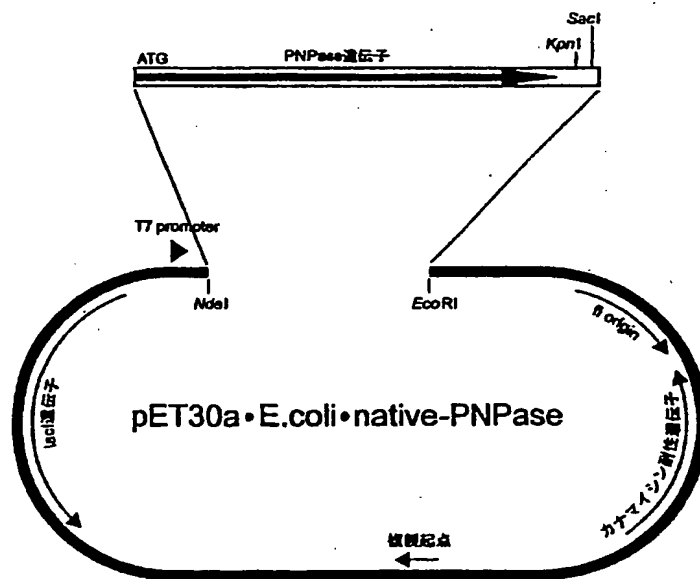


図 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 3

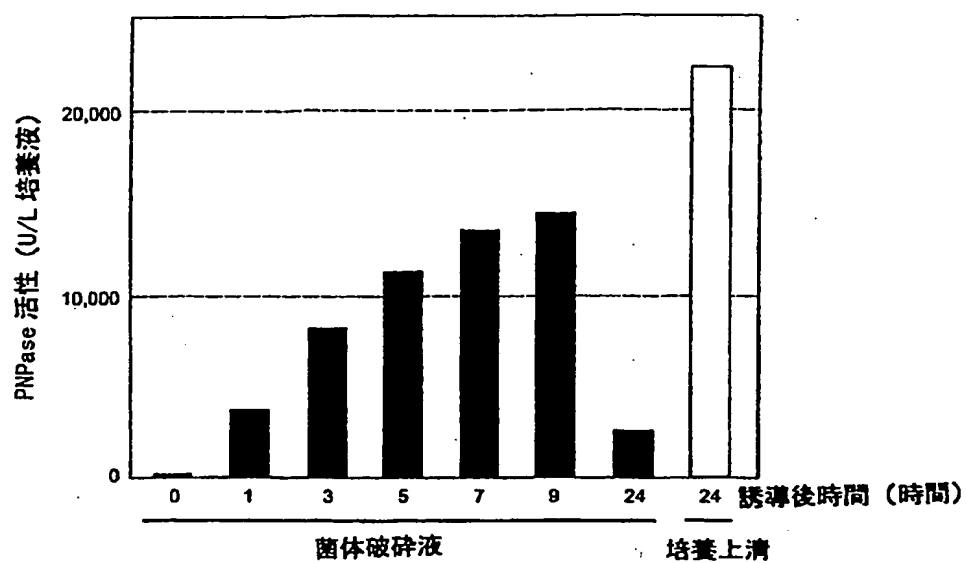
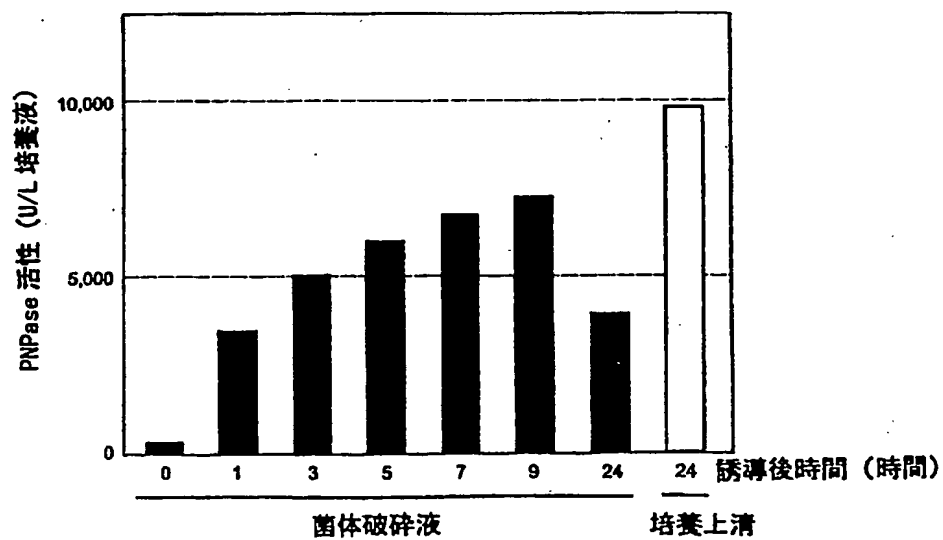


図 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 5

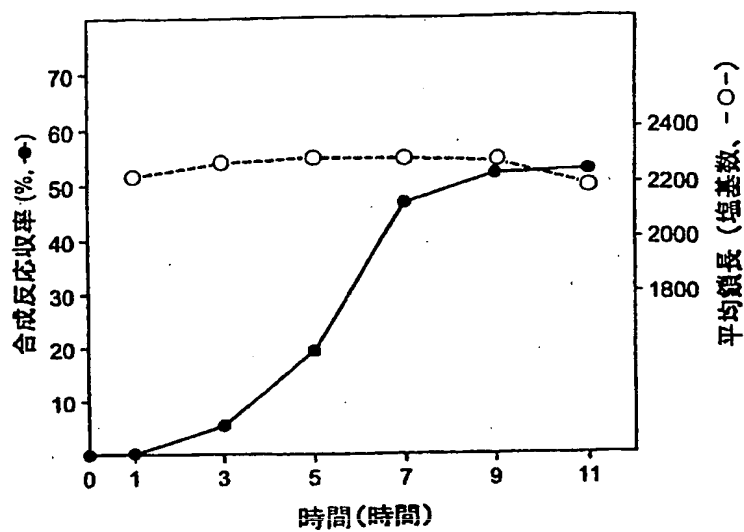
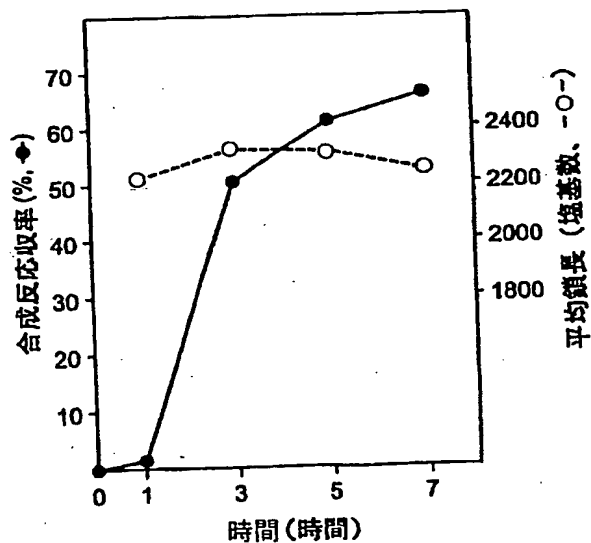


図 6



THIS PAGE BLANK (USPTO)